

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007557858

WPI Acc No: 1988-191790/198828

XRAM Acc No: C88-085557

**Prodn. of polyester(s) by fermentation - using pseudomonas oleovorans,
excess carbon source and limiting quantity of at least one other
nutrients**

Patent Assignee: RIJKSUNIV GRONINGEN (UYGR-N); UNIV RIJKS TO GRONINGEN
(UYRI-N)

Inventor: LAGEVEEN R G; WITHOLT B

Number of Countries: 011 Number of Patents: 009

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 274151	A	19880713	EP 87202379	A	19871201	198828 B
NL 8603073	A	19880701	NL 863073	A	19861202	198830
JP 63226291	A	19880920	JP 87305516	A	19871202	198843
US 5135859	A	19920804	US 87127216	A	19871201	199234
EP 274151	B1	19940316	EP 87202379	A	19871201	199411
DE 3789377	G	19940421	DE 3789377	A	19871201	199417
			EP 87202379	A	19871201	
US 5334698	A	19940802	US 87127216	A	19871201	199430
			US 91770180	A	19911002	
CA 1335370	C	19950425	CA 553209	A	19871201	199524
JP 2642937	B2	19970820	JP 87305516	A	19871202	199738

Priority Applications (No Type Date): NL 863073 A 19861202

Cited Patents: 7.Jnl.Ref; A3...8830; EP 89039; JP 61070991; No-SR.Pub

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	--------	----------	--------------

EP 274151	A	E 27		
-----------	---	------	--	--

Designated States (Regional): BE CH DE FR GB IT LI NL

US 5135859	A	18		
------------	---	----	--	--

EP 274151	B1	E 34		
-----------	----	------	--	--

Designated States (Regional): BE CH DE FR GB IT LI NL

DE 3789377	G			Based on patent EP 274151
------------	---	--	--	---------------------------

US 5334698	A	20		Div ex application US 87127216
------------	---	----	--	--------------------------------

Div ex patent US 5135859

JP 2642937	B2	16		Previous Publ. patent JP 63226291
------------	----	----	--	-----------------------------------

Abstract (Basic): EP 274151 A

A process for producing polyesters by aerobically culturing microorganisms with nutrient limitation is characterised by culturing *Pseudomonas oleovorans* (PO) bacteria under aerobic conditions in a nutrient medium contg. an excess of a carbon source, and a limiting quantity of at least one of the other nutrients essential for growth, the carbon source comprising at least one assimilable acyclic aliphatic hydrocarbon cpd. and if desired, recovering the biopolymer formed from the cells.

USE/ADVANTAGE - The structure of the biopolymer can be easily controlled by selecting the substrate. Polyester type biopolymers can be produced with side chains whose length can be varied in an adjustable manner and which may contain a terminal double bond. Owing to the terminal double bonds, the resulting biopolymer can easily be chemically modified in a controllable percentage of the side chains or cross-linked with other polymer chains. The polyesters obtd. can be used to form e.g. sutures, films or skin or bone grafts, or can be hydrolysed to produce optically active carboxylic acids or esters.

0/8

Abstract (Equivalent): EP 274151 B;

A process for producing polyesters by aerobically culturing micro-organisms with nutrient limitation, characterised by culturing *Pseudomonas oleovorans* bacteria under aerobic conditions in a nutrient medium contg. an excess of a carbon source and a limiting quantity of at least one of the other nutrients essential for growth, and if desired recovering the biopolymer formed from the cells, the carbon

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

第2642937号

(45)発行日 平成9年(1997)8月20日

(24)登録日 平成9年(1997)5月2日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/62			C 1 2 P 7/62	
// A 6 1 L 17/00			A 6 1 L 17/00	
27/00			27/00	C
C 0 8 G 63/06	NLP		C 0 8 G 63/06	NLP
63/52	NPD		63/52	NPD

発明の数1(全16頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願昭62-305516

(22)出願日 昭和62年(1987)12月2日

(65)公開番号 特開昭63-226291

(43)公開日 昭和63年(1988)9月20日

(31)優先権主張番号 8 6 0 3 0 7 3

(32)優先日 1986年12月2日

(33)優先権主張国 オランダ (NL)

(73)特許権者 999999999

リジュークスユニバシテイテ テ グロニン
ゲン

オランダ国 9712 ビーシー グロニン
ゲン, プロアストラット 5

(72)発明者 バーナード ウィゾルト

オランダ国 9761 エイチアール エル
デ, レンブラントヴェッグ 9

(72)発明者 ローランド ゲルハルト ラビゲーン
オランダ国 9726 シーエル グロニン
ゲン, ファン ヘムスケルクストラッド
24

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

審査官 新見 浩一

(56)参考文献 J. Bacteriol 154 (2)
P. 870-878 (1983)

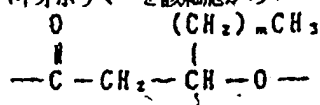
(54)【発明の名称】 酵素によるポリエステル製造方法、光学活性カルボン酸およびエステルの製造方法、およびポリエステルを含む製品

1

2

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】微生物を栄養源制限下で好気的に培養することによって、ポリエステルを製造する方法であって、シェードモナス オレオボランス細菌を好気条件下で、少なくとも1種の資化可能な非環状脂肪族炭化水素化合物を含有する炭素源の過剰量と、生育に必須の他の栄養源の少なくとも1種の制限量とを含有する栄養培地で培養すること；および必要に応じて、形成されたバイオポリマーを該細胞から*



ここで、mは2～8の整数である。

【請求項3】次の構造式(1)を有する単位と次の構造式(2)を有する単位とから構成されるポリエステル ※

*回収すること、ただし、1種類の炭素源のみを用いる場合はn-オクタンを除く、を包含する方法。

【請求項2】次の構造式(1)を有する単位から構成されるポリエステルを、6～12個の炭素原子を有するパラフィンまたはパラフィン酸化合物を1種またはそれ以上含有する炭素源を用いることによって、生産することを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の方法：

(1)

※を、6～12個の炭素原子を有する非分岐1-オレフィンの1種またはそれ以上を含有する炭素源を用いることによって、生産することを特徴とする特許請求の範囲第1

【請求項14】11個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて、7個および/または9個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組み合わせて用いることによって、側鎖が4個、6個および8個の炭素原子を有する ($m=6, 5$ および 7) 共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項15】10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と、11個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質とを、必要に応じて、6個、7個、8個および/または9個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組み合わせて用いることによって、側鎖が3個、4個、5個、6個、7個および8個の炭素原子を有する ($m=2, 3, 4, 5, 6$ および 7) 共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項16】12個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて、6個、8個および/または10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組み合わせて用いることによって、側鎖が3個、5個、7個および/または9個の炭素原子を有する ($m=2, 4, 6$ および 8) 共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項17】11個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と、12個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質とを、必要に応じて、6個、7個、8個、9個および/または10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組み合わせて用いることによって、側鎖が3個、4個、5個、6個、7個、8個および9個の炭素原子を有する ($m=2, 3, 4, 5, 6, 7$ および 8) 共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項18】7~11個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を用いることを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項19】8~10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を用いることを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項20】窒素またはリン制限で前記好気培養を行うことを特徴とする特許請求の範囲第1項から第19項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項21】窒素制限で前記好気培養を行うことを特徴とする特許請求の範囲第1項から第20項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項22】前記好気培養が、 $pH5\sim9$ 、好ましくは約7にて、および $37^{\circ}C$ を下まわる温度、好ましくは約 $30^{\circ}C$ で行われることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第21項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項23】前記好気培養が、好ましくは空気による飽和の約50%の溶存酸素分圧で、十分に攪拌して行われることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第22項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項24】前記好気培養が、二液相系で行われることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第23項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項25】栄養源制限による前記好気培養が、細胞密度が少なくとも $2g/l$ に達する、栄養源制限なしの対数増殖期後に、行なわれることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第24項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項26】栄養源制限による定常期に形成される前記バイオポリマー含有細胞が、該細胞のバイオポリマー含有の顕著な低下が起こる前に、採取されることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第25項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項27】前記バイオポリマーが、前記採取細胞をスフェロプラストへ変換し、音波振動処理によってこれらを破碎し；そして遠心分離した後に形成される最上層を分離し；さらに必要に応じて、洗浄と乾燥を行うこと、によって単離されることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第26項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項28】前記バイオポリマーが、化学的に修飾されることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第27項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項29】光学的に活性なカルボン酸またはエステルを製造する方法であって、特許請求の範囲第1項から第28項のいずれか1つに記載の方法により生産されるポリエステルを加水分解すること；および

必要に応じて、得られたモノマーをエステル化することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

(産業上の利用分野)

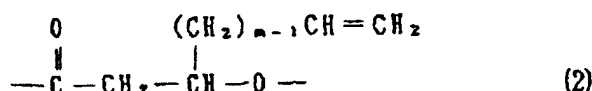
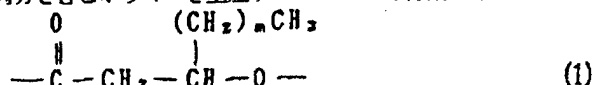
本発明は、栄養源制限下における微生物の好気的培養によるポリエステルの製造方法に関する。

(従来の技術)

このタイプの方法はヨーロッパ特許公開公報第0015669号に開示されている。そこでは、PHBと呼ばれるポリ(3-ヒドロキシ酪酸)の調製が述べられている。この調製は、あるメチロバクテリウム *オルガノフィラム* (*Methylobacterium organophilum*) 株の栄養制限下、特に窒素および/またはリンの制限下における好気培養による。使用し得る炭素源は、安価なメタノールである。他の微生物もまたPHBの製造を目的として提案されている。それには例えば、ヨーロッパ特許公開公報第0046344号に開示されているアルカリゲネス (*Alcaligenes*) 種および *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23 (1986) 332-329に記述のあるシュードモナス (*Pseudomonas*) 株がある。

は、側鎖のない化合物であるが、側鎖のある化合物も同様に用いられ得、ポリマーになり得る。

飽和および不飽和側鎖の両方を含むポリマーを生産す*



(ここで、 m は2～8の整数である。)

この生産は、6～12個の炭素原子を含み、側鎖を持たない1種またはそれ以上の1-アルケン、および必要に応じて6～12個の炭素原子を含み、側鎖を持たない1種またはそれ以上のパラフィンまたはパラフィン酸化物を含む炭素源を用いて行われる。1-アルケンを唯一の炭素源として用いる場合においても、生成するバイオポリマーの側鎖の一部は飽和している。しかし、飽和および不飽和側鎖の比率は、基質の混合物(例えばオクタンおよびオクテン)を用いることにより変化させ得る。

本発明のこの変法は、特に利点を有している。末端の二重結合のために、得られるバイオポリマーは側鎖の割合を制御して化学的に容易に修飾または他のポリマー鎖と架橋し得る。

本発明の好適な実施態様は、6個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を用いて、側鎖が3個の原子を有する($m=2$)ポリエステルを生産することにより特徴づけられる。ヘキセン、またはヘキセンおよびヘキサンを含む基質を用いる場合には、バイオポリマーの側鎖の一部は末端二重結合を含む。

本発明の他の好適な実施態様は、7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を用い、側鎖が4個の炭素原子を有する($m=3$)ポリエステルを調製することにより特徴づけられる。側鎖の一部に末端二重結合を有するポリエステルは、用いられる基質がヘプテン、またはヘプテンおよびヘプタンである場合に得られる。

上記の好適な実施態様は両者とも、本質的に、全ての側鎖が同数の炭素原子を有するポリエステルの生産である。以下に述べる好適な実施態様は、そのような例ではない。

本発明のそのような好適な実施態様は、6個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を用い、側鎖が3個および4個の炭素原子を有する($m=2$ および3)共重合ポリエステルの生産により特徴づけられる。これらおよび全ての他の実施態様において、基質の選択およびそのお互いの比率の両者において多くの変更が可能であり、そして、これらの変更は、バイオポリマーにおける種々の側鎖の比率を事実上無限に変えることができる。従ってこの実施態様においては、次の組合せが用いられ得る：ヘキサンおよびヘプタン；ヘキセンおよびヘプテ

* 本発明の方法は、構造式(1)を有する単位と構造式(2)を有する単位とで構成されるポリエステルを生産することによって特徴づけられる。

10※ン；ヘキサンおよびヘプタン；ヘキセンおよびヘプタン；ヘキサン、ヘキセンおよびヘプタン；ヘキサン、ヘキセンおよびヘプテン；ヘキサン、ヘプタンおよびヘプテン；ヘキセン、ヘプタンおよびヘプテン；そしてヘキサン、ヘキセン、ヘプタンおよびヘプテン。そして、これらの組合せのそれぞれにおいて、種類の基質間の比率は所望の値に選択することができる。

他の実施態様は、8個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質、そして、必要に応じて6個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて用いて、側鎖が3個および5個の炭素原子を有する($m=2$ および4)共重合ポリエステルの生産することにより特徴づけられる。好適な基質は1-オクテンであり、必要に応じてオクタン、ヘキサンおよび/またはヘキセンが組合せて用いられる。

次に、好適な実施態様は、7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と8個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて6個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて用い、側鎖が3個、4個および5個の炭素原子を有する($m=2,3$,および4)共重合ポリエステルの生産することにより特徴づけられる。

さらに好適な実施態様は、9個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて用い、側鎖が4個および6個の炭素原子を有する($m=3$ および5)共重合ポリエステルの生産することにより特徴づけられる。

さらに他の好適な実施態様は、8個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と9個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質とを、必要に応じて、6個および/または7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて用い、側鎖が3個、4個、5個および6個の炭素原子を有する($m=2,3,4$ および5)共重合ポリエステルの生産することにより特徴づけられる。

次の好適な実施態様は、10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて6個および/または8個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて用い、側鎖が3個、5個および7個の炭素原子を有する($m=2,4$ および6)共重合ポリエステルの生産することにより特徴づけられる。

13

テル以外に大量の脂質および脂肪酸を含有する。これらを、例えば、10倍量のエタノール中でポリマーを沈澱させることにより除去する。ポリマーが沈澱後、上澄をデカンテーションで除き、ポリマーの沈澱を圧縮空気を上に流すことにより乾燥させる。ポリマーを次に、好ましくは、できるだけ少量のクロロホルムに溶解させ、ついで濾過後、10倍量のエタノールで再沈澱させる。得られた沈澱を再び最小容量のクロロホルムに溶解させ、その後、上記溶液を鋳型に注ぎ、蒸発させることにより、合成プラスチック材が得られる。蒸発はこの材料を真空下でしばらくの間50℃に保持することにより促進され得る。

このようにして得られるポリエステルは、該ポリエステルから、その全体または一部が構成される、縫糸、フィルム、皮膚、または骨移植材などの製品に利用され得る。

上記PHBについて記載した利用はまた、本発明により生産されたポリエステルにも適用される。特に注目されるのは、得られたバイオポリマーを化学的に修飾する可能性であり、この可能性はこのポリエステルが末端に二重結合を有する側鎖を含む場合に、特にうまく実現される。他のポリマー鎖との架橋もまた可能である。

本発明はまた、光学的に活性なカルボン酸またはエステルを生産する方法を提供し、それは、本発明により生産されたポリエステルの加水分解、および必要に応じて行われる生じたモノマーのエステル化により特徴づけられる。上述のように、そのような光学活性化合物は、化学的手段を用いた場合は、光学的に純粋な形で容易に得られない。本発明は従って、そのような光学的に純粋な化合物の製造を容易に達成する方法を提供する。それには例えば、薬剤の製造における中間体、または純粋に科学のおよび/または応用を指向した研究への利用性があり得る。使用した基質の相異により、このプロセスにより異なったモノマーが生じた場合には、必要に応じてこれらは既知方法(モノマーの鎖長および/または飽和度の違いを利用した方法)により分離され得る。

本発明は、次の実験により詳述される。

1. バイオポリマーの構造

オクタンによる生育の間のシュードモナス オレオボランスによる重合物質の生合成は、1983年にDe Smetらにより初めて示された。このポリマーは、メタノリシスされたモノマーの元素分析、赤外吸収スペクトル、およびガスクロマトグラフィーにより、ポリ-3-ヒドロキシブチレート様(PHA)ポリエステル、おそらくポリ-3-ヒドロキシオクタノエートと同定された。その後、3つの同定化合物が、有機化学的な経路で合成され(Ketelaar, Tetrahedron Letters 26 (1985), 4665-4668)、その後このポリマーの絶対構造の決定が可能となった。

メタノリシスされたモノマーと、合成された(S)-3-ヒドロキシヘキサノエート メチルエステル、

14

(S)-3-ヒドロキシオクタノエート、メチルエステル、および(S)-3-ヒドロキシデカノエート メチルエステルとを比較することによって、シュードモナス オレオボランスによりオクタンで生育後に形成されるポリマーは、(R)-3-ヒドロキシヘキサノエートおよび(R)-3-ヒドロキシオクタノエートから成ることが確立された。オクタンでの生育後に形成されるポリマーの一般的な構造式を第1図に示す。第1図において、Rはアルキル基 $-(CH_2)_mCH_3$ 、またはアルケニル基 $-(CH_2)_{m-1}-CH=CH_2$ を示し、ここでmは2~8整数である。基質としてオクタンを用いる場合には、バイオポリマーは、モノマー(R)-3-ヒドロキシヘキサノ酸エステル($R=C_6H_{13}$)と、(R)-3-ヒドロキシオクタノ酸エステル($R=C_8H_{17}$)との共重合体である。

形成される他のポリマーにおけるモノマーの同定(以下参照)は、そのポリマーの酸メタノリシスが有効であり、その後精製したモノマーのメチルエステルを、ガスクロマトグラフィーと連結したマススペクトロメトリーで分析した。

2. 分析

細胞内に貯蔵されるポリマーの形成に関する反応動力学を分析するために、ポリマーの量を短時間で少量の培養試料(バイオマス)で測定し得る手段を用いて、再現性のある方法を開発した。この方法は、微生物バイオマス中のポリ-3-ヒドロキシブチレートの測定に対するBrauneggら(Eur. J. Microbiol. Biotechnol. 6 (1978) 29-37)の方法に基づいて開発した。

その方法によると、細胞培養の全試料を同時に加水分解とメタノリシスを行い、その後ポリマーから形成されたモノマーのメチルエステルを、ガスクロマトグラフィーで分析する。2つのピークの典型的なガスクロマトグラフィーとマススペクトルを第2図に示す。第2図Aはオクタンで培養した細胞の分析後のGLCパターンを示す。矢印で示すピークは重合物質に由来する。t=5分のピークは内部標準(安息香酸メチルエステル)である。第2図Bは最も重要なGLCピークのMSパターンを示す。175におけるピークは3-ヒドロキシオクタノ酸メチルエステルモノマーのプロトン化型であり、192におけるピークは NH_4^+ -3-ヒドロキシオクタノ酸メチルエステルを示す。第2図Cは、より小さいGLCピークのMSパターンを示す。147および164におけるピークはそれぞれ3-ヒドロキシヘキサノ酸メチルエステルのプロトン化誘導体およびアンモニウム誘導体を示す。

この方法をシュードモナスのポリマーに対して開発するために、n-オクタンによるシュードモナス オレオボランスの定常期培養の同一細胞試料を、100℃にて様々な時間により、そしてメタノール中における種々の濃度の硫酸で加水分解を行った(第3図)。第3図は、オクタンで生産されたバイオポリマーの加水分解時およびメタノリシス時におけるインキュベーションの時間および硫

50

塩の制限,そして第5図Dはイオウの性げを行った場合のものである。黒丸は細胞密度,そして白丸はバイオポリマーの量を示す。以下の表1は、これら栄養源制限の生成ポリマー量に対する効果を示し、細胞乾燥重量の百分率で示した。

表1: ポリマー生成に対する制限の効果

制限	ポリマー(%)
P	15
S	7
Mg	10
N	15

一般に、ポリマーの生成は、窒素とリン酸制限下で最良であると結論し得る。

5.他のパラフィンによるポリマーの形成

表2: 種々のn-アルカンに対してシュードモナス オレオボランスにより生成されるバイオポリマーおよびその組成

炭素源	ポリマーの量 (1)	醗酵時間 (時間)(2)	ポリマー組成 (3)						
			3-OH-C6	3-OH-C7	3-OH-C8	3-OH-C9	3-OH-C10	3-OH-C11	3-OH-C12
ヘキサン	1.2	22	1						
ヘプタン	6.7	22		1					
オクタン	12.5	31	0.11		0.89				
ノナン	9.2	27		0.33		0.67			
デカン	12.5	31	0.10		0.66		0.24		
ウンデカン	8.4	54		0.23		0.63		0.14	
ドデカン	3.4	54	0.02		0.31		0.36		0.31

(1) バイオポリマーの最大量であり、単位はg/g細胞乾燥重量。

(2) バイオポリマーの量が最大に達する醗酵時間であり、単位は時間。

(3) バイオポリマーにおける種々のモノマーの相対的な組成:

3-OH-C6: 3-ヒドロキシヘキサノエート

3-OH-C7: 3-ヒドロキシヘプタノエート

3-OH-C8: 3-ヒドロキシオクタノエート

3-OH-C9: 3-ヒドロキシノナノエート

3-OH-C10: 3-ヒドロキシデカノエート

3-OH-C11: 3-ヒドロキシウンデカノエート

3-OH-C12: 3-ヒドロキシドデカノエート

シュードモナス オレオボランスが全てのこれらパラフィンに対してポリマーを生成し得ることがわかる。最良の増殖基質であることが知られている基質、すなわちオクタンおよびノナンは、ポリマー形成に最良の基質でもある。ポリマーの組成は、用いた基質に依存する。炭素数が偶数のパラフィンで生育後、炭素数が偶数のモノマーが全例で形成され、そして炭素数が奇数のパラフィンは、常に炭素数が奇数のモノマーとなる。これらモノマーは、常に3-ヒドロキシアルカノエートであり、鎖長が基質の長さからC₆に変動する。C₆およびC₉モノマー※50

* 上記の第4項で述べたように決定した、ポリ-3-ヒドロキシアルカノエート生成の最適条件を用いて、他のパラフィンを、ポリマー形成のための基質としての可能を調べた。シュードモナス オレオボランスがC₆~C₁₂のn-パラフィンで生育し得ることを示す文献があるので、これらの化合物をまず調べた。

前培養の上を第3項のように行い、そして本培養を上第4項の窒素制限条件で行った。細胞密度およびポリマーの百分率は、上の第3項に示すように測定した。

10 増殖およびポリマー形成の結果を第6図に要約する。第6図において、使用されたパラフィンは、n-ヘキサン(第6図A)、n-ヘプタン(第6図B)、n-ノナン(第6図C)、n-デカン(第6図D)、n-ウンデカン(第6図E)、およびn-ドデカン(第6図F)である。黒丸は細胞密度を、そして白丸はバイオポリマーの量を示す。表2は、ポリマーの最大生成量、この最大値に達する時間、および生成ポリマーのモノマー組成を示す。

※一に対して、ポリマー生成酵素は最大の特異性を有するようである。

6. オレフィンによるバイオポリマーの形成

シュードモナス オレオボランスは、またn-オレフィンを唯一の炭素源およびエネルギー源として利用できる。バイオポリマーがこれらの基質でもまた形成されるかどうかを検討した。この研究のための醗酵は、上の第5項に従って行った。細胞密度およびポリマーの百分率は、第3項に示すように定量した。

これら不飽和パラフィンによって生育した後生成し

21

クタンとの1:1混合物で加えられた。

醗酵は、第3項のように、1ℓの攪拌タンク反応容器で、10～15%の有機層を用いて行った。

表5は、このようにして試験した基質、およびこの場合に、種々のモノマーを有するポリマーが実際に生成するか否かを示す。また、オクタン分解の第1中間体である1-オクタノールが、生育およびポリマーの基質として用い得るかどうかを調べた。これは、1-オクタノールを唯一の炭素源およびエネルギー源として、シュードモナス オレオボランスを培養した場合に見出された。

ポリマー生成が、またさらに酸化されたパラフィン（オクタノール、オクタン酸）による生育の間にも起こることが期待される。

表5:他の炭化水素による生育の間のシュードモナス オレオボランスによるバイオポリマーの形成

基質	バイオポリマー形成	生育 ¹
n-オクタン	+	卅
1-オクタノール	+	卅
2-オクテン	+	+
2-メチル-1-オクテン		卅
1-オクチン	-	+
4-オクチン		+
1,3-オクタジエン		+
1,4-オクタジエン		+
2,2-ジメチルヘプタン		+
2,2-ジメチルオクタン		卅
2-オクタン	-	-
n-ジブチルエーテル	+	+

1 “生育”で示した欄における記号は、次の意味である:

- 生育しない、
- + 最終OD値が1と5の間である中程度の生育、
- 卅 最終OD値が5と10の間である適度の生育、
- 卅 最終OD値が10を超えるオクタンによる生育に匹敵する良好な生育。

9.他の菌株によるオリマーの形成

上に述べたすべての実験は、シュードモナス オレオボランスTF4-1L (ATCC 29347)を用いて行った。この菌株は、時々GPo-1と呼ばれる。この野性型に加えて、数多くの関連菌株を、オクタンまたは1-オクタノールによる生育後のポリマー形成について調べた:

GPo-12:OCTプラスミドを保持しないGPo-1。

PpG-1:シュードモナス プチダ,Chakrabartyにより単離されたものでプラスミドを含まない。

PpG-6:OCTTプラスミドを保持するPpC-1。

22

PpS-124:CAM/OCT融合プラスミドを保持するPpG-1。

これらの菌株は、250mlのエーレンマイヤーフラスコ中の50mlE*培地(第3項参照)で、4%オクタン、または0.4%CTプラスミドがない場合には、4%1-オクタノールを、唯一の炭素源およびエネルギー源として用いて試験した。

表6:GPo-1関連菌株によるポリ-3-ヒドロキシオクタノエートの生産

菌株	プラスミド	基質	ポリマーの量(%) ⁽¹⁾	
			50mlの培養物中	プレート上
GPo-1	OCT	オクタン	5.9	
GPo-1	OCT	1-オクタノール	2.9	
GPo-12	-	1-オクタノール	-	6.1
PpG-1	-	1-オクタノール	7.7	24.8
PpG-6	OCT	オクタン	1.8	
PpS-124	CAM/OCT	オクタン	0.02	+(2)

(1):細胞乾燥重量あたりの百分率であるが、絶対的な最大値ではない。

(2):明らかに検出可能。

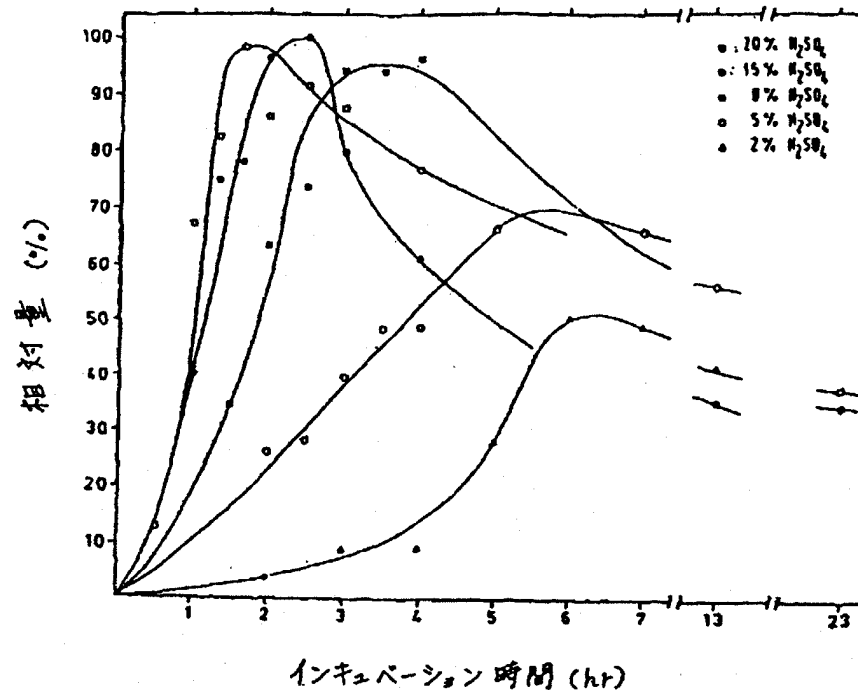
プラスミドを保持しない株、すなわちPpG-1が、細胞内にポリ-3-ヒドロキシオクタノエートを蓄積する事実から、ポリマー合成に関与する酵素がプラスミドではなく、染色体にコードされていると結論し得る。

得られた結果は、またアルカノール、アルデヒド、カルボン酸、ジアルカノール、ジアルデヒドおよびジカルボン酸を単一炭素源として用いる場合にも、ポリマー生成が起こることを証明するか、あるいは示唆する。

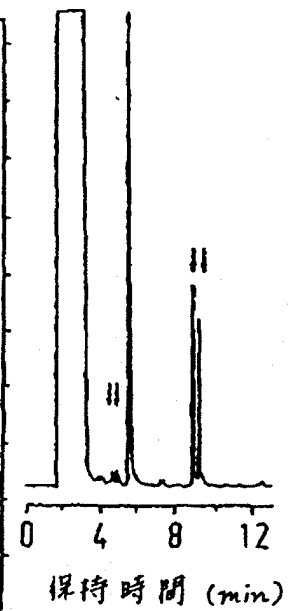
10.ポリ-3-ヒドロキシアルカノエートのポリマー特性

精製ポリ-3-ヒドロキシオクタノエート-3-ヒドロキシヘキサノエート (PHOH) および精製ポリ-3-ヒドロキシオクタノエート-3-ヒドロキシオクタノエート-3-ヒドロキシヘキサノエート-3-ヒドロキシヘキサノエート (PHOHU) の分子量 (MW)、融点 (T_m) およびガラス転移温度 (T_g) を決定した。得られた値を表7に示す。比較のために、ポリ-3-ヒドロキシブチレート (PHB) の値も示す。

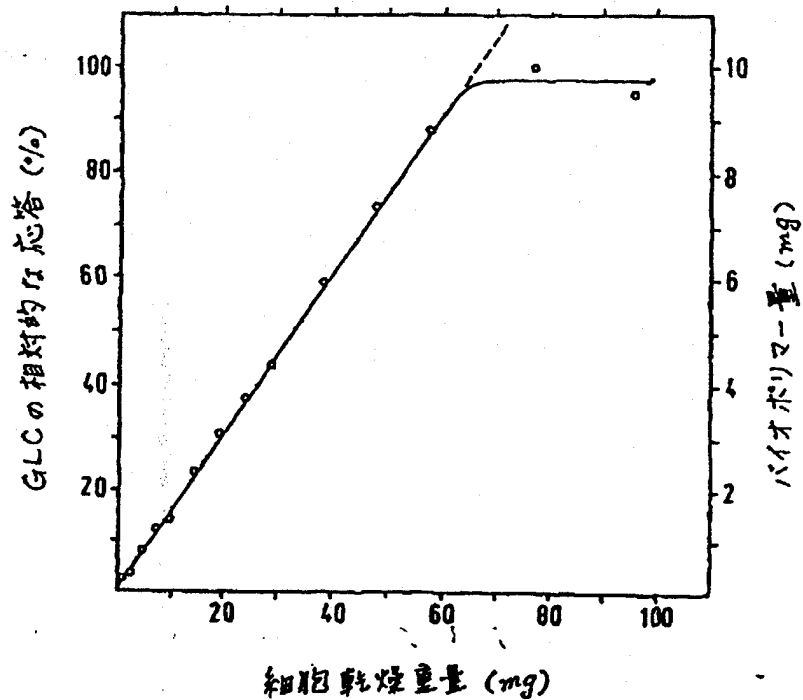
【第3図】



【第7図】



【第4図】



【第6図】

